

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251029

研究課題名(和文) 頭尾極性の起源

研究課題名(英文) Origin of Anterior-Posterior Polarity Axis in the Mouse

研究代表者

濱田 博司 (HAMADA, Hiroshi)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00208589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の頭尾の極性は、発生過程のどの時期に・どのような仕組みで決まっているのだろうか？ この疑問に対して以下の点を明らかにした。

(1) 将来の頭側を決める細胞が出現する機構：将来の頭尾を決める細胞(DVE)は、Nodal シグナルで誘導される、Lefty1 は将来DVEになる細胞の数を制限している、胚盤胞の中でランダムに選ばれていることを明らかにした。

(2) 卵子に存在するNodal シグナルが母性因子として、着床後の胚発生・細胞分化を制御している。また、卵子中でNodal シグナルによって制御されている遺伝子を探索・同定し、そのうちの2～3が着床後の胚発生に重要であった。

研究成果の概要(英文)：How is the anterior-posterior polarity of mammalian body determined? Exactly when is it determined, and what is the mechanism? We have addressed these questions, and have obtained following results.

1) The mechanism that specifies DVE, a group of cells that determines the anterior-posterior polarity: DVE is induced by Nodal signaling, the number of future DVE cells is negatively regulated by Lefty, an inhibitor of Nodal, future DVE cells are randomly selected from blastomeres before implantation.

2) Nodal signaling in oocytes acts as a maternal factor and regulates cell specification during pre-implantation development. We have searched for target genes of maternal Nodal signaling, and have identified a few functional target genes of maternal Nodal signaling.

研究分野：発生生物学

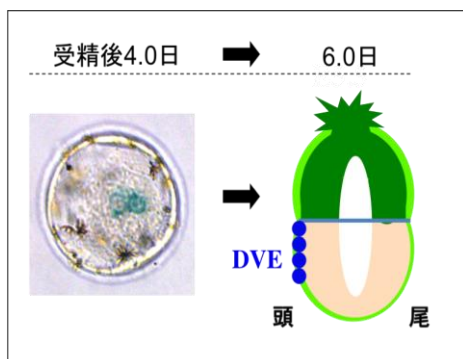
キーワード：胚発生 体軸 非対称性 細胞系譜

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の頭尾の極性は、いつ、どのような機構で決定されるのだろうか？ 従来の研究では、受精後 5.5 日目に遠位臓側内胚葉 (DVE) と呼ばれる細胞が対称な位置から片方へ移動すると、移動先が将来の頭側になることが知られていた。しかし、最近の我々の研究 (*Dev Cell*, 2006; *Nat. Cell Biol.*, 2011) により、『*Lefty1* が、胚盤胞の時期から、将来 DVE になるべき細胞のみで発現する』ことがわかり、頭尾極性の起源が胚盤胞の時期まで遡ることが示唆された。*Lefty* は *Nodal* シグナルを抑制するシグナル因子である。TGFβ superfamily に属する *Nodal* と *Lefty* は胚発生の初期において極めて重要なシグナル因子であり、i) 体の頭尾の決定、ii) 左右の決定、iii) 中胚葉の形成・パターンニングなどを制御する。*Nodal-Lefty* が果たす一部の機能は明らかにされた一方で、発生の他の局面での役割は調べられていない。では頭尾の極性の起源は、いったいどこまで遡ることが出来るのだろうか？ この研究では、*Lefty1* の胚盤胞での発現を糸口にして、その発現制御機構と発現の意義を調べることで、この問題に迫りたい。現在備えている実験材料や技術を考えると、申請者のグループは、これらの問題を解明することができる世界で数少ない研究グループである。

2. 研究の目的

(1) 将来の頭尾を決める細胞が決定される機構：胚盤胞で *Lefty1* を発現した 1~2 個の



細胞は、将来の頭尾を決める細胞 (DVE: distal visceral endoderm) になる (Takaoka et al., *Nat. Cell Biol.*, 2011)。胚盤胞の細胞の中で、なぜ 1-2 個の細胞だけが *Lefty1* を発現するのか？ その機構を知ることができれば、頭尾の極性の起源に迫る事が出来る。その糸口として、胚盤胞での *Lefty1* の発現を制御するエンハンサー (ASE) を同定した。これらのエンハンサーの活性を制御しているシグナルを同定する事で、DVE となる細胞が選ばれる機構を明らかにする。その結果、*Nodal/FoxH1* シグナルと未知のシグナルによって発現が制御されていることがわかった (高岡ら、未発表)。今後は、未知のシグナルの実体を解明するとともに、2つのシグナルの空間的な制御機構を明らかにしたい。

(2) DVE を誘導しているシグナルの由来と働き：上記の研究で明らかにした、DVE を誘導しているシグナルの由来と働きを明らかにする。すなわち、由来としては、そのシグナルは卵細胞に存在するか、もし存在するならば、母性因子として働いて受精後の胚発生 (とくに DVE の形成など) を制御しているのか？ これらの疑問を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 着床前胚における *Lefty1* の発現を制御しているエンハンサー (ASE) の最小単位を、トランスジェニック胚を作成する事で、詳細にマッピングした。マップされた約 200 bp の配列について、種々の哺乳動物において保存されている配列を探索した結果、*FoxH1* 結合配列が必須である事が判った。*FoxH1* は、*Nodal* シグナルを伝える転写因子なので、このことより、*Nodal* シグナルが *Lefty1* の発現を誘導していることが判った。*Nodal* やその inhibitor である *Lefty* の役割を知るために、受精~着床にいたる時間での発現パターンをライブイメージングで調べた。さらに、

Nodal mRNA を異所的に inject したさいの、inject された割球や周辺の割球での Lefty1 の発現 (の変化) を、経時的に観察した。最後に Lefty を欠損するマウスを作成し、DVE へと運命決定された細胞の数が変化するか否かを調べた。

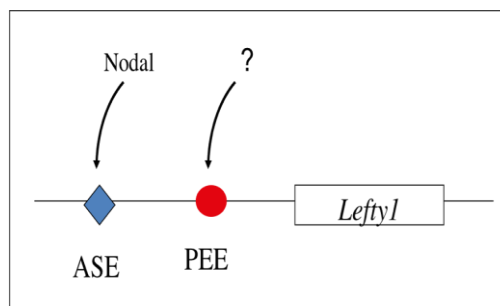
(2) 上記の方法で明らかにしたシグナル (Nodal シグナル) について、発生のどの時期まで遡ることができるのか? まずは、受精前の卵細胞でオンになっているかを調べた。Nodal シグナルを構成する各因子 (Nodal, Crypto, FoxH1, Smad2) の卵細胞での発現の有無を、卵巣の切片を用いた免疫染色や in situ hybridization で調べた。次に、卵細胞において、Nodal/FoxH1/Smad2 シグナルによって制御されている遺伝子を同定した。具体的には、保存された FoxH1 結合配列を持つ 350 のマウス遺伝子について、正常と変異マウスの卵巣切片を用いた in situ hybridization によりスクリーニングを行い、FoxH1 や Smad2 を欠損する卵細胞で発現が変化する遺伝子を探索した。Nodal シグナルを欠損する卵細胞で発現が変化していた遺伝子については、Flox 変異マウスを作成 (入手) し、卵細胞特異的な Cre (Zp3Cre) マウスを用いて、卵細胞特異的に遺伝子を欠損させた。調べたい遺伝子を X とすると、X(Flox/flox); Zp3Cre ♀マウスと、野性型♂マウスを交配し、受精後 3.5 日で胚を回収し、形態や種々のマーカー (細胞分化マーカー) の発現を主に免疫染色で調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 将来の頭尾を決める細胞が決定される機構 :

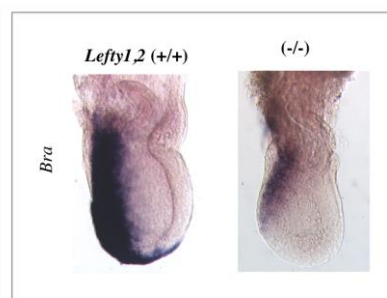
胚盤胞の細胞の中で、なぜ 1-2 個の細胞だけが Lefty1 を発現する予定 DVE 細胞に選ばれるのか、この点を明らかにした。まずは、胚盤胞において Lefty1 の発現を制御するエンハンサー(ASE)を、トランスジェニ

ックアッセイで詳しくマッピングし、約 200bp が最小単位である事が判った。この



塩基配列を他の哺乳動物の Lefty1 と比較したところ、FoxH1 結合配列が保存されていた。マウス Lefty1 の ASE 中の FoxH1 結合配列を変異させると Lefty1 の発現が消失し、また FoxH1 変異マウスにおいても Lefty1 の発現が消失していた。以上より、予定 DVE 細胞は、Nodal シグナルで誘導されている事が示唆された。着床前胚における Nodal と Lefty1 の発現をライブイメージングで観察すると、一番最初の Nodal 発現が ON になった細胞、あるいは隣接した細胞で Lefty1 が ON になっていた。また、Nodal mRNA をランダムな 1 つの割球に inject すると、inject された細胞・あるいは隣接した細胞が Lefty1 を発現開始した。

一方で、Lefty1 は予定 DVE 細胞の単なるマーカーではなく、予定 DVE 細胞の数を正確に制限している事が判った。すなわち、Lefty1 (&Lefty2) を欠損する胚では、予定 DVE 細胞の数が顕著に増加していた。なお、Lefty1, Lefty2 の両者を欠損する胚は、受精後 6 日ころに中胚葉形成が不全に



なるという予想外の症状を呈した。この異

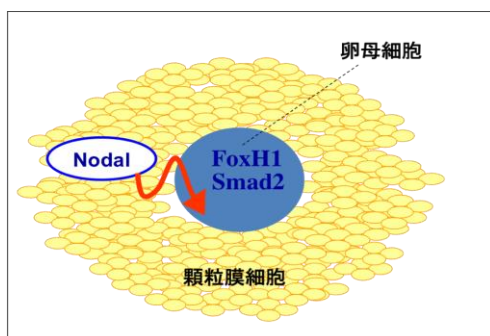
常は単独変異胚とは逆であり (*Lefty2* 変異胚では、中胚葉が過形成)、着床前胚での *Lefty* の発現が欠損したためと考えられる。

胚盤胞の中に多数存在する割球から 1~2 細胞が予定 DVE 細胞として選ばれるのは、flexible で robust なメカニズムと考えられた。すなわち、*Lefty1* 陽性細胞を機械的に除去しても、別の細胞が *Lefty1* を発現し始めた。

以上の結果に加えて、胚盤胞の中で *Lefty1* 陽性細胞の位置がランダムである (規則性がない) こと、*Nodal* mRNA をランダムな割球に inject して *Lefty1* 陽性細胞を異所的に誘導しても、予定 DVE 細胞の数に変化はなく、その後の発生も正常に進む事より、着床前胚に置いて *Lefty1* 陽性の細胞 (予定 DVE 細胞) は、事前に決められているわけではなく、ランダムに選ばれていることが示唆された。以上の結果は、論文として準備中である。

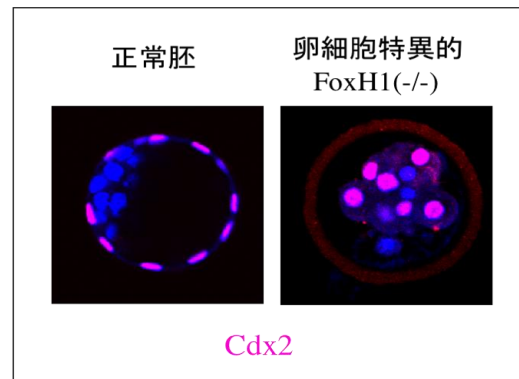
## (2) 予定 DVE 細胞を誘導している *Nodal* シグナルの由来と働き：

まずは、*Nodal* シグナルの種々の構成因子 (*Nodal*, *Cryptic*, *FoxH1*, *Smad2*) の卵細胞での発現の有無を調べた。その結果、調べたすべての構成因子が卵細胞で ON になっている事が判った。さらに、*Nodal-FoxH1* の活性をモニターできる遺伝子も卵細胞で ON であったので、*Nodal* シグナル経路が卵細胞で活性化されている事が示唆された。



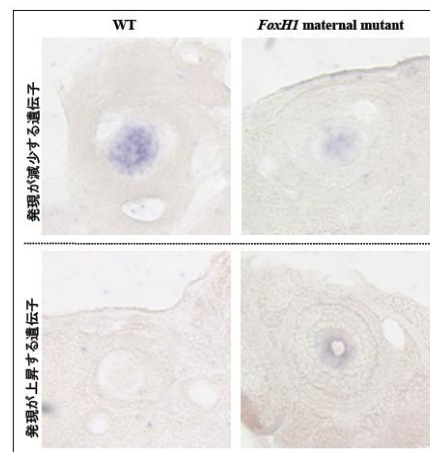
次に、卵細胞における *Nodal* シグナルの意義を知るために、各遺伝子について flox 変

マウスを作成・あるいは入手し、卵細胞特異的な Cre (*Zp3Cre*) を用いて卵細胞で特異的な遺伝子欠損を行った。*Nodal*, *FoxH1*, *Smad2* について、(*Flox/flox*); *Zp3Cre* ♀ マウスと野性型 ♂ マウスを交配し、受精後 3.5 日で胚を回収し、形態や種々のマーカー (細胞



分化マーカー) の発現を主に免疫染色で調べたところ、いずれの場合も良く似た発生異常が認められた。すなわち、細胞分裂が停止して胚盤胞を形成できない。また、*Cdx2* や *Nanog* のパターンが異常になる事から、一番最初にかかるべき細胞分化が異常である事が示唆された。これらの結果は、卵細胞で活性化されている *Nodal* シグナルが、母性因子として、受精後の細胞分裂や細胞分化を制御している事を示した。

次にゲノム情報から *Foxh1* の標的と考えられた約 300 の遺伝子について、*FoxH1* あるいは *Smad2* を欠損する卵細胞で、発現が変化する遺伝子を探索した結果、発現が低下する 5 つの遺伝子と、上昇する 1 つの遺伝子を同定した。



得られた6つの遺伝子 (Nodal シグナルの標的遺伝子) について、同様に Flox 変異マウスを作成・入手し、Zp3Cre を利用して卵細胞に特異的な欠損マウスを作成した。各々について母性因子としての役割の有無を調べたところ、FoxH1 や Smad2 と同様に、着床前期で細胞分裂や細胞分化の異常が認められた。従って、これらの遺伝子は、卵細胞における Nodal シグナルの機能的な標的遺伝子である事が示唆された。

\*これらの研究成果を論文発表として準備していた際に、ここで用いた Zp3Cre マウス (Jackson ラボから入手) に問題があり、Zp3Cre だけで一部の胚に異常が生じている事が判った。従って、上記の Zp3Cre マウスを用いて得られた結果の一部には、artifact が混入している可能性が高い。現在は、別の Zp3Cre マウスを Jackson ラボから入手し、artifact を排除し真の phenotype だけを抽出しようとしている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

(1) Hamada, H. (2015). Role of physical forces in embryonic development. *Seminars in Cell and Dev. Biol.*, 47/48:

88-91.DOI:10.1016/j.semcdb.2015.10.011.

査読有り

(2) Takaoka, K. and Hamada, H. (2014). The origin of cellular asymmetry in pre-implantation mouse embryo: a hypothesis. *Philos. Trans. Roy. Soc. B.* 20130536. Dec. 5, 369(1657), DOI:

10.1098/rstb.2013.0536. 査読有り

(2) Wu, Q., Kanata, K., Rie Saba, R., Deng, C-X. Hamada, H. and Saga, Y. (2013). Nodal/Activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming

in somatic cells. *Development* 140:291-300..

doi: 10.1242/dev.087882. 査読有り

[学会発表] (計 1件)

(1) 2015.09.16-10. Mouse Molecular Genetics 2015. Welcome Trust Genome Campus, Hinxton, UK. [Material Noal signaling in pre-implantation development] as a Rossa Beddington Lecture.

[その他]

ホームページ:

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hamada/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田博司 (HAMADA, Hiroshi)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号: 00208589

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし